



EESTI MAAÜLIKOOL

Metsandus- ja maaehitusinstituut

Merili Pai

**BIOPREPARAAT ROTSTOP® JA KARBAMIIDI
EFEKTIIVSUSE HINNANG JUUREPESSU TÕRJEL
HARILIKU KUUSE (*Picea abies* (L.) Karst.) PUISTUS
EFFECTIVITY TO CONTROL ROTSTOP® AND UREA IN
NORWAY SPRUCE (*Picea abies* (L.) Karst.) STAND**

Bakalaureusetöö

Metsanduse õppekava

Juhendajad: teadur Tiia Drenkhan, *PhD*

dotsent Rein Drenkhan, *PhD*

Tartu 2019

Eesti Maaülikool		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Merili Pai		Õppekava: Metsandus	
Pealkiri: Biopreparaat ROTSTOP® ja karbamiidi efektiivsuse hinnang juurepessu tõrjel hariliku kuuse (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.) puistus			
Lehekülgi: 40	Jooniseid: 5	Tabeleid: 5	Lisasid: 2
Õppetool: Metsakasvatuse ja metsaökoloogia ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1. Bio- ja keskkonnateadused; 1.5. Metsandusteadus; CERCS ERIALA: B430 Metsakasvatus, metsandus, metsandustehnoloogia; PÕHISUUND: metsapatoloogia Juhendaja(d): Tiia Drenkhan <i>PhD</i> , Rein Drenkhan <i>PhD</i> Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2019			
Bakalaureusetöös uuriti juurepessu tõrjevahenditena kasutatava biopreparaat ROTSTOP® ja keemilise ühendi karbamiid ehk urea efektiivsust juurepessu tõrjel hariliku kuuse puistus. Lisaks analüüsiti hiidkooriku (<i>Phlebiopsis gigantea</i>) ehk Rotstopi alusorganismi olemasolu ja elujõulisust talvise raie järel pritsitud kuuse kändudes. Töö katseala asus Järvelja Õppe- ja Katsemetskonna Rõka kuusikus (kv JS299, er 18), kus katseala jagati kuueks võrdseks proovitükiks ning kahel alal teostati kändude (kokku N=100 kändu) töötlemine karbamiidiga, kahel alal Rotstopiga ning üks proovitükk jäi kontrolliks ja üks raiumata. Bakalaureusetöö jaoks koguti proove 2017. aasta sügisel, kuid varasemad proovid on kogutud (enne töötlemist) 2015. aasta juulis ja sama aasta detsembris (5 kuud pärast töötlemist). Analüüsitud proovidest selgus, et enne töötlemist oli kogu katsealast nakatunud juurepessu 19% kändudest, viis kuud pärast töötlemist 25,5% ning 24 kuud hiljem oli juurepessu osakaal kuuse kändudes langenud 10,8%-ni. Hiidkooriku tuvastamiseks disainiti DNA-põhine liigispetsiifiline praimer, mida edukalt käesolevas töös testiti. Hiidkooriku olemasolu kontrolliti kuuse kändudes (N=100) enne töötlemist ning seene loodulik levik oli 7%, 5 kuud pärast töötlemist 46% ning kaks aastat hiljem 20%. Tulemustest järeldati: Rotstopi ja karbamiidi pritsimine kuuse kändudele enam kui kolme kuulise viitega peale raiet ei andnud juurepessu tõrjeks rahuldavaid tulemusi võrreldes kontrollalaga; kuuse kändude pritsimine on otstarbekas vahetult raie käigus või kohe peale raiet; Rotstop preparaadi ja karbamiidi kasutamise efektiivsus 24 kuud hiljem			

oli peaaegu võrdne.

Märksõnad: *Heterobasidion* spp., biopreparaat, *Phlebiopsis gigantea*, liigispetsiifiline PCR parimer, juurepessu tõrje

Estonian University of Life Sciences		Abstract of Bachelor's Thesis	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Author: Merili Pai		Speciality: Forestry	
Title: Effectivity to control ROTSTOP® and urea in Norway spruce (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.) stand			
Pages: 40	Figures: 5	Tables: 5	Appendixes: 2
Chair: Silviculture and forest ecology Field of research and (CERC S) code: Bio- and environmental sciences; 1.5. Forest science; CERCS SPECIALITY: B430 Silviculture, forestry, forestry technology; Main direction: Forest pathology Supervisors: Tiia Drenkhan <i>PhD</i> , Rein Drenkhan <i>PhD</i> Place and date: Tartu, 2019			
<p>The aim of the bachelor thesis is to study the effect of ROTSTOP® and urea to control root rot (<i>Heterobasidion</i> spp.) in Norway spruce (<i>Picea abies</i>) dominated stand. Another aim is to analyse the survival of <i>Phlebiopsis gigantea</i> in spruce stumps after the stump treatment. Samples were collected from Järvselja training and experimental area, Rõka (compartment 299-18). There were six sampling sites where stump treatments were done: two areas were treated with urea, two areas with ROTSTOP and two were left as control areas (one of them was unthinned).</p> <p>Samples were collected three times: before stump treatment (July 2015), 5 months after the treatment (December 2015) and 2 years later (October 2017). The analysis showed that 19% of the stumps were infected with <i>Heterobasidion</i> spp. before the treatment, 5 months after the treatment 25.5% and 2 years later 10.8%.</p> <p>To detect <i>P. gigantea</i> fast and precisely, a DNA based PCR primer has been worked out, which was successfully tested in this work. The existence of <i>P. gigantea</i> was controlled in spruce stumps before the stump treatment (7%), 5 months after the stump treatment (46%), which was favoured by Rotstop, and two years later (20%). However, ROTSTOP® and urea treatment 3 months after thinning showed not good results to control root rot in Norway spruce stumps. The treatment with Rotstop should be done simultaneously as thinning or urgently after thinning. In this study the efficiency of Rotstop and urea were almost equal 24 months after stump treatment.</p>			
Keywords: <i>Heterobasidion</i> spp., biocontrol, <i>Phlebiopsis gigantea</i> , species specific PCR			

primer, root rot control

SISUKORD

SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1 Juurepessu (<i>Heterobasidion</i> spp.) üldiseloomustus	10
1.1.1 Kuuse-juurepess (<i>H. parviporum</i> Niemelä & Korhonen)	11
1.2 Hiidkooriku (<i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich) ülevaade.....	12
1.3 Juurepessu tõrje võimalused	13
1.3.1 ROTSTOP®	13
1.3.2 Karbamiid.....	14
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	15
2.1 Katseala üldiseloomustus ja teostatud raied	15
2.2 Välitööd	16
2.2.1 Välitööd 2017. aastal.....	17
2.3 Laboratoorsed tööd	19
2.3.1 DNA eraldamine	19
2.3.2. Reaalaja ehk kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon (RT-PCR).....	19
2.3.3 Liigispetsiifiline polümeraasahelreaktsioon (<i>species specific</i> PCR).....	20
2.3.4 Geelelektrofees.....	21
2.3.5. Andmetöötlus	21
3. TULEMUSED	22
3.1. Visuaalne kändude mädaniku hinnang	22
3.2. Juurepessu liigilise koosseisu määramine ja tõrje efektiivsus	23
3.4. Hiidkooriku esinemine.....	25
4. ARUTELU	27
KOKKUVÕTE	31
KASUTATUD KIRJANDUS	33
LISAD	37

Lisa 1. Hiidkooriku esinemisega proovid ning nende real-time PCR analüüsi näidud (Ct-value).	38
Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	40

SISSEJUHATUS

Juurepess (*Heterobasidion* spp.) on põhjapoolkera okaspuumetsades kõige olulisem patogeen, tekitades juure- ja tüvemädanikku (Woodward jt., 1998). Juurepessu levik on intensiivne vegetatsiooniperioodil (keskmine ööpäevane õhutemperatuur +5 °C ja enam) mil juurepessu eosed koloniseerivad intensiivselt värskaid männi- või kuusekändusid ning seejärel levib patogeen puistus juurte kaudu edasi naaberpuudele (Risbeth, 1951a; Vasiliaskas jt., 2005). Patogeen (*Heterobasidion* spp.) nakatab eelkõige okaspuid, harilikku kuuske (*Picea abies* (L.) Karst.) ja harilikku mändi (*Pinus sylvestris* L.) (Berglund ja Rönnberg, 2004). Juurepessu kahjustused on suurimad hariliku kuuse puistutes, mis Eestis moodustavad 18,5% metsamaast (Aastaraamat..., 2017).

Juurepessu poolt on ohustatud eelkõige viljakatel rähk- ja jääkkarbonaatsetel ning samuti ka leetunud muldadel kasvavad jänesekapsa- ja sinilillekuusikud (Hanso ja Hanso, 1999a). Juurepessu leviku ärahoidmiseks tuleks vältida okaspuupuistutes suviseid raied, kui see pole võimalik, siis kasutada raiejärgset kändude töötlemist (Hanso ja Õunap, 2016). Juurepessu tõrjeks on kasutatud lämmastiku rikast ühendit karbamiidi ehk ureat või puidulagundajast seene hiidkooriku (*Phlebiopsis gigantea*) baasil valmistatud Biopreparaati ROTSTOP®. Seda sellepärast, et praktikute huvi on olnud teada saada kahe tõrjemetoodika sisulistest erinevustest ning sedagi, kui pikalt peale raiet juurepessu tõrjega võiks viivitada, näiteks talviste raiete järel.

Bakalaureusetöö välitööd toimusid 2017. aastal Järvelja Õppe- ja Katsemetskonnas, laboritööd teostati 2017-2018. aastal töö autori poolt Eesti Maaülikooli metsapatoloogia- ja geneetika laboris. Töös käsitletud katseala on rajatud 2015. aastal, kui koguti ka esimesed proovid. Tegemist on pikaajalise katsega, mille kohta on koostatud varasemalt üks bakalaureusetöö (Tannberg, 2016), milles uuriti eelkõige juurepessu esinemist ja osakaalu kändudes enne ja peale karbamiidi ja Rotstop preparaadi kasutamist kui kändude töötlemisest oli möödunud viis kuud.

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks on analüüsida karbamiidi ja Rostopi® efektiivsust juurepessu tõrjel kaks aastat peale töötlemist. Töös analüüsitakse põhjalikumalt Rotstop preparaadi alusorganismi (hiidkooriku *Phlebiopsis gigantea* Fr. Jülich.) esinemist

kändudes: a) vahetult enne kändude töötlemist; b) 5 kuud peale kändude töötlemist; c) 24 kuud peale töötlemist. Töö teise eesmärgina analüüsiti juurepessu tõrje võimalust olukorras, kus pritsimine tehti enam kui kolm kuud peale raiet. Kolmanda eesmärgina testiti käesoleva töö jaoks disainitud hiidkooriku reaalaja ehk kvantitatiivset PCR metoodikat (RT-PCR) ja liigispetsiifilist praimerit. Seda selleks, et edaspidises eksperimentaalses ja teaduslikus töös saaks nimetatud praimerit kasutada.

Töö esimeses osas esitatakse kirjanduse ülevaade juurepessust (*Heterobasidion spp.*) üldiselt ning kitsamalt kuuse-juurepessust (*H. parviporum*), lisaks kuuse-juurepessu tõrjevõimalustest kasutades biopreparaati ROTSTOP® ja karbamiidi. Töö materjali ja metoodika osa kirjeldatakse katseala, väli- ja laboratoorseid töid. Tulemuste ja arutelu peatükis analüüsitakse tulemusi ning arutletakse saadud tulemuste üle.

Autor avaldab tänu oma juhendajatele Tiia Drenkhan'ile ja Rein Drenkhan'ile, kes andsid väga olulise panuse bakalaureusetöö valmimisele. Lisaks suur tänu Kalev Adamson'ile ja Katrin Jürimaa'le labortööde juhendamise eest.

Käesolev töö on osa RMK projektist (2019-2021) „Biotõrje efektiivsus ja antagonistlike seente kasutamine juurepessu tõrjes hariliku kuuse puistutes ning erinevate taimetüüpide nakatumine viljakates kasvukohatüüpides“.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Juurepessu (*Heterobasidion* spp.) üldiseloostus

Juurepess (*Heterobasidion* spp.) on meie metsade ja kogu põhja parasvöötme kõige ohtlikum juuremädaniku tekitaja okaspuupuistutes (Hanso ja Hanso, 1999b). Eestis on juurepess enim levinud harilikul kuusel (*P. abies*) ja harilikul männil (*P. sylvestris*), kuid esineb ka harilikul kadakal (*Juniperus communis*), arukasel (*Betula pendula*), lehisel (*Larix* sp.), nulul (*Abies* sp.) ning ebatsuugal (*Pseudotsuga* sp.). Lisaks võib patogeen esineda mõnel alustaimestiku liigil – harilik kanarbik (*Calluna vulgaris*) ja harilik mustikas (*Vaccinium myrtillus*) (Hanso ja Hanso, 1999b). Juurepessu kuulub hõimkonda kandseened (*Basidiomycota*) ning on valgemädaniku tekitajaga (Woodward jt., 1998; Hanso ja Hanso, 1999b). Juurepessu viljakehad on mitmeaastased, kujult ebakorrapärase, pealt pruunikad, alaosa kollakasvalge ning silmaga selgelt eristuvate pooridega (Joonis 1). Eestis on levinud kaks juurepessu liiki: männi-juurepess (*H. annosum*) ja kuuse-juurepess (*H. parviporum*). Juurepessu olemasolu üheks tunnuseks puistus on puude kasvupidurdus ja seda nii radiaal- kui kõrguskasvus. Juurepess levib kas otseselt, mil nakatumine toimub eoste abil (generatiivselt) ja seda juhul kui puul on juurekaela või juurevigastusi, või kaudselt, kui eosed nakatavad värsked okaspuukäde ja juurekontaktide kaudu levib see puult-puule (Drenkhan, 2006). Juurepessu nakatavad eelkõige värsked kännud ja seda perioodil kui ööpäeva keskmine õhutemperatuur on üle +5° C, sest sel perioodil on õhus kõige rohkem juurepessu eoseid (Drenkhan, 2011). Vältimaks juurepessu kahjustusi tuleks raiuda talvisel ajal (Swedjemark ja Stenlid, 1993), kuid see ei pruugi täielikult patogeeni levikut ära hoida, kuna eosed võivad levida nakkusohtlikutele aladele ning tüvel külmaga ellu jääda, ilmade soojenedes koloniseerivad eosed kännud (Piri ja Korhonen, 2008). Soovituslik on eelistada külvamist või looduslikku uuenemist, lageraiejärgselt juurepessust kahjustatud okaspuupuistu uuendamisel eelistada puistu uuendamisel lehtpuud, puistu loodusliku uuenemise puhul tuleks hooldamisel kaasa aidata segapuistu tekkele (Hanso ja Õunap, 2016).



Joonis 1. Kuuse-juurepessu tekitaja *Heterobasidion parviporum* viljakeha kuuse juurel. (Foto autor: Rein Drenkhan)

1.1.1 Kuuse-juurepess (*H. parviporum* Niemelä & Korhonen)

Kuuse-juurepess on levinud peamiselt Põhja-Euroopas, kuid seda leidub ka Kesk- ja Lõuna-Euroopas (Woodward jt., 1998). Kuuse-juurepess on levinud harilikul kuusel, kuid võib esineda ka harilikul männil. Seda on leitud ka keermännilt (*Pinus contorta*), siberi lehiselt (*Larix sibirica*) ning arukaselt (*Betula pendula*) (Piri, 1996). Kuusel võib mädanik levida poole tüve kõrgusele (kuni 12 m), kahjustatud on puujuured ning enamasti lõpeb juurepessu nakatumine puu tuuleheitena (Hanso ja Õunap, 2016). Kuuse-juurepessu eristab männi-juurepessust viljakeha alaosas olevad poorid, mis on kuuse-juurepessu puhul väiksemad ja kitsamad (millimeetril 4-6 poori). Olulisimaks erinevuseks on kuuse-juurepessu viljakeha pinnal olev pehme viltjas kiht. Kuuse-juurepessu viljakehasid võib leida ja kahjustusi märgata eelkõige laanemetsades, salumetsades ja lookuusikutes. Viljakehad kasvavad valdavalt kuuse juurte all, kuid need võivad areneda ka kändudel ja lamatüvedel (Niemelä, 2008).

1.2 Hiidkooriku (*Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich) ülevaade

Hiidkoorik (*P. gigantea*) on meie metsades ja üleüldiselt põhjapoolkeral tavaline seen (Hanso ja Drenkhan, 2005), mis kasvab surnud okaspuu puidul ning tekitab puidus valgemädanikku. Tegemist on saprotroofiga ehk surnud puidu lagundajaga. Hiidkooriku olemasolu võib halvendada metsas ladustatava puitmaterjali kvaliteeti, sest seen suudab areneda nii kändudel kui ka puiduvirnadel. Viljakeha on valkjashall või tuhmkollane, kuni poole millimeetri paksune ning substraadile liibunud (Joonis 2). Kuna seen vajab substraadi suurt niiskusesisaldust, siis vanemate viljakehade puhul, mis on kuivanud, tulevad servad substraadi küljest lahti ning rulluvad üles (Holdenrieder ja Greig, 1998; Hanso ja Drenkhan, 2005).



Joonis 2. Hiidkooriku (*Phlebiopsis gigantea*) viljakeha hariliku kuuse kännul. (Foto autor: Tiia Drenkhan)

1.3 Juurepessu tõrje võimalused

1.3.1 ROTSTOP®

1950-ndatel aastatel avastas John Risbeth võimaluse juurepessu tõrjumiseks. Ta oli varem teinud avastuse, et värskelt raiutud kännud suurendavad juurepessu levikut juurte kaudu (Risbeth, 1951a,b; Pettersson jt., 2003), kuid patogeeni levikut on võimalik pärssida kasutades selleks teist seent - hiidkoorikut (*P. gigantea*).

Suurbritannias tehti hiidkoorikul põhineva preparaadi valmistamisega algust juba 1968. aastal, mil toodeti hiidkoorikul põhinevat õliemulsiooni. 1970. aastast alustati seenest pulbrilise preparaadi valmistamisega, millele lisati vett ning see pritsiti kännule, kuid sellest ei piisanud kuusekändude kaitsmiseks juurepessu nakkuse eest (Korhonen jt., 1994). Seetõttu hakati Soomes alates 1991. aastast tootma kohaliku päritolu hiidkooriku tüve baasil preparaati Rotstop, mille vesilahus osutus kohalikes oludes efektiivsemaks (Korhonen jt., 1994; Drenkhan, 2006). Eestis on see biotõrjevahendina registreeritud 2004. aastal (Hanso ja Õunap, 2006; Drenkhan, 2011).

Hiidkooriku oiidid on vastupidavad kuivamisele ning seetõttu valitigi just see seen mitmete juurepessu suhtes antagonistlikuks osutunud seente seast bioregulaator Rotstop tootmiseks (Drenkhan, 2011). Lisaks on Rotstopi eeliseks teiste tõrjevahendite ees hiidkooriku eostest arenev mütseeli võime tungida ka kännu sisemusse ja juurtesse, et takistada maa-alust juurepessu levikut (Hanso ja Õunap, 2006).

Biopreparaati soovitatakse kasutada kuuse- ja männikändude töötlemisel harvendus- ja lõppraie järgselt kohe pärast raiet ning kindlasti tuleks seda teha ajal, mil levivad juurepessu eosed, s.t vegetatsiooniperioodil, kui ööpäeva keskmine õhutemperatuur on üle +5 °C (Drenkhan, 2011). Rotstopi on võimalik kasutada kahel viisil: kasutades seljaskantavat käsipritsi, millega tuleb tõrje teostada manuaalselt peale raiet või harvesterile paigaldatud seadme abil, mis pritsib Rotstopi suspensiooni kohe raie käigus. Rootslaste poolt läbi viidud uuringute põhjal on meetodite efektiivsuse erinevus minimaalne (Thor ja Stenlid, 2005).

Kasutades Rotstop biopreparaati lisatakse suspensioonile TurfMark looduslikke värvitablette (Verdera OY, Soome), mis muudab pritsimise järel kännud siniseks ehk

pritsitud kände on kerge ära tunda. Tänu värvitabletile on lihtne kontrollida pritsimise kvaliteeti (Drenkhan, 2006).

1.3.2 Karbamiid

Karbamiid ehk urea on orgaaniline aine, mis koosneb süsinikust, lämmastikust, hapnikust ja vesinikust (keemiline valem $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). Karbamiid on kontsentreeritud (N=46%) vees lahustuv lämmastikväetis ning praegusel ajal kasutusel aiakultuuride külvielseks või kasvuaegseks väetamiseks (Baltic Agro, 2019). Juurepessu tõrjel on kasutatud karbamiidi 20-30% vesilahust Suurbritannias ja Iirimaal (Drenkhan, 2006).

Karbamiidiga töötlemise järel substraadi pH suureneb (Johansson jt., 2002) ning kuna karbamiid hävitab kandseente (*Basidiomycetes*) kolooniad kännus ja ergutab paljude kändudel mitte-elutsevate mikroorganismide arengut, siis pole juurepess võimeline kändu uuesti koloniseerima. Karbamiidi kasutamise tulemusel suureneb kändudes mitmete kottseente (*Ascomycetes*) ning teisseente (*Deuteromycetes*) osakaal (Johansson jt., 2002). Kuna karbamiidist tekkinud organismid pole võimelised tungima kännu sisemusse, siis saab juurepess risosfääris endiselt levida (Drenkhan, 2006). Hinnates karbamiidi mõju metsa alustaimestikule selgus, et töötlemise järel võib mulla pH suureneda kuni 2 ühikut (Westlund ja Nohrstedt, 2000; Drenkhan, 2006).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Katseala üldiseloomustus ja teostatud raied

Käesoleva bakalaureusetöö katseala asub Tartu maakonnas, Kastre vallas, Järvelja Öppe- ja Katsemetskonnas (ÖKMK). Järvelja metskonna üldpindala on 10 553 ha, millest metsamaa moodustab 6626 ha ja sood 3147 ha. Metsamaast on kaitse all 41% (2723 ha), millest omakorda range kaitse all 5% (323 ha). Puistutest on enamlevinud kaasikud (59%), männikud (20%) ja kuusikud (10%). Järvelja metsade kasvukohatüüpidest valdava osa moodustavad madalsoo, angervaksa, jänesekapsa-mustika ja jänesekapsa-kõdusoo (SA Järvelja Öppe- ja Katsemetskond, 2019).

Tööks vajalikud andmed koguti Järvelja ÖKMK kvartalilt JS299, eraldiselt 18 (endine eraldise number oli 17, mille põhjal on ka käesoleva töö joonised 3 ja 4), nn. Rõka kuusikust. Varasemalt kuulus eraldis 17 alla ka eraldis 19 (endine eraldis 18) ning kus 2007. ja 2009. aastal teostati lageraie ja kuhu istutati kask. Eraldise 18 (endine eraldis nr 17) kogupindala on 1,44 ha ja tegemist on jänesekapsa kasvukohatüübiga. Puistu koosseisus oli enne harvendusraiet 95% kuusk, 5% kask, kuuse vanus 62 aastat (Tabel 1) (Järvelja Metsamajandamise Infosüsteem). Hetke koosseisus on 98% kuusk ning 2% kask (Metsaregister, 2019). 2015. aastal teostati katsealal (eraldisel 18) harvendusraie.

Tabel 1. Kvartal JS299, eraldis 18 takseerandmed. (Järvelja Metsamajandamise Infosüsteem).

Er nr	Rin-	Koosseis		Pärit	Van	H	D	N	G	Täi-	Tagavara		Raie	Kahjustuse		
Pind	ne	%	PL	olu	a	m	cm	tk/ha	m ² /ha	us	tm/ha	tm/er	%	liik	%	aste
17	1	95	KU	K	62	26,0	23,0	842	36,6	96	435	626		Juurepess	50	K
1,44	1	5	KS	S	60	28,0	24,0	36			21	30				

Kõlvik: *tootlik metsamaa*, arenguklass: *keskealine mets*, kasvukohatüüp: *jänesekapsa*, inventeeritud: **08.10.2015**, kõrgusindeks: **33,3 m**, lamapuit: **5 tm/ha**, surnud puit: **20 tm/ha**, juurdekasv: **11,9 tm/ha/a**.

Tööliik	Pindala	Järjekord	Plan. aasta	Teht. aasta	PL	N
Harvendusraie	1,44	tehtud tööd		0	2015	

Kvartalil JS299 eraldis 18 on enne 2015. aasta harvendusraiet teostatud sanitaarraie (2005. aastal), kui raie teostati 1,1 hektaril, väljaraie 28 tm.

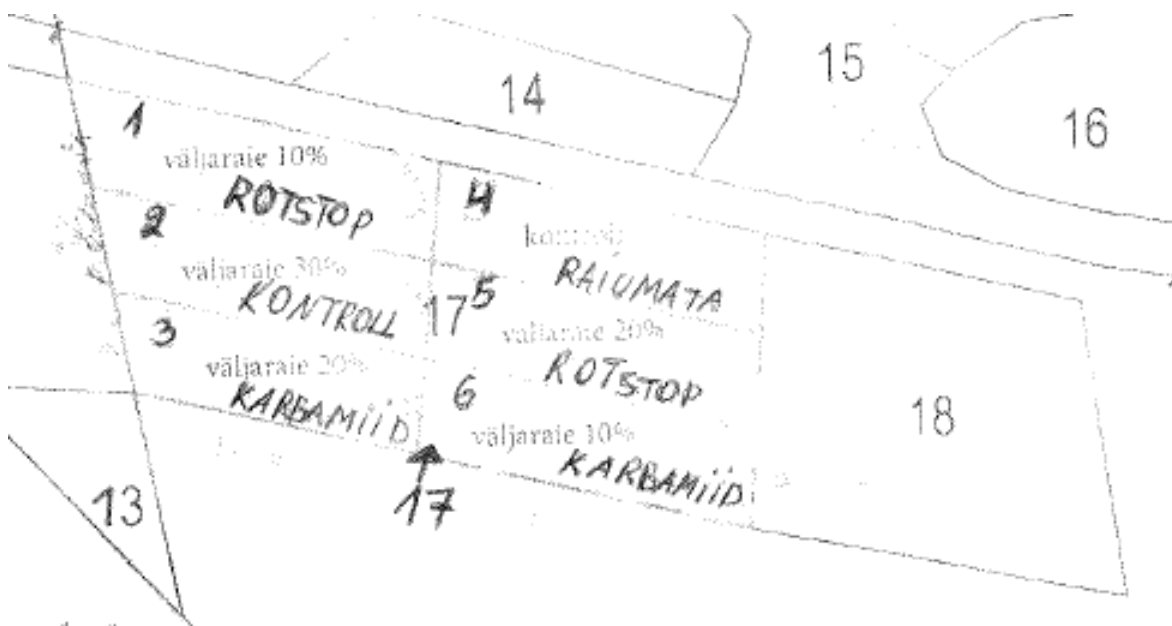
2.2 Välitööd

Katseala (kv. JS299, er 18) jagati kuueks, hinnanguliselt võrdsete mõõtmetega proovitükkideks. Kahel proovitükil teostati juurepessu tõrjeks kändude töötlemine bioprepraadiga ROTSTOP (proovitükid 1 ja 5), kahel proovitükil karbamiidiga (proovitükid 3 ja 6) ning lisaks oli kaks kontrollala (2 ja 4), kus töötlemist ei tehtud. Nendest proovitükk 2 on raiutud, proovitükk 4 raiumata. Proovitükid on üksteisest eraldatud väljaveoteedega ning iga proovitüki nurgas on post proovitüki numbriga, samuti on proovitüki number kirjutatud proovitüki nurgas kasvavale puule (Joonis 3).



Joonis 3. Proovitüki märgistus. (Foto autor: Tiia Drenkhan)

2015. aasta märtsikuus teostati katsealal harvendusraie (proovitükkidel 1, 2, 3, 5, 6), väljaraie vahemikus 10-30% (Joonis 4).



Joonis 4. Proovitükkide asetus Järvelja kvartalil JS299 ja eraldisel 18 (varasema numeratsiooni alusel eraldis 17).

2015. aasta 1. juulil teostati katsealal kändude mõõtmised, tehti mädaniku hinnangud ning koguti enne kändude töötlemist esmased saepuruproovid (2015_1) (Tannberg, 2016). Raie ja kändude töötlemise vaheline periood oli enam kui 3 kuud, eesmärgiks oli analüüsida kas juurepessu vastast töötlemist on otstarbekas rakendada ka mõne kuu möödudes raie või tuleks kändude töötlemine teostada siiski kohe vahetult peale raie nagu on soovitatud. Töötlemise järgne puiduproovide kogunemine toimus 2015. aasta detsembris (2015_2) ehk 5 kuud peale kändude esmatöötlemist. Kändude töötlemise, märgistamise ja proovide kogumise metoodikat on kirjeldatud Tannberg (2016) bakalaureusetöös.

2.2.1 Välitööd 2017. aastal

Käesoleva bakalaureusetöö jaoks koguti 2017. aasta oktoobrist detsembrini (edaspidi tähistatud 2017) kokku 100 kännult saepuruproovid, igal proovitükil 20 kändu, kõikidelt koguti kahes korduses saepuruproovid. Proovid koguti varasemalt tähistatud kändudel (Tannberg, 2016). Saepuruproovide kogumiseks eemaldati kännu pinnalt peitli abil

pealmine ca 1 cm puidukiht ning proov koguti järgmisest puidukihist kahes korduses 2,0 ml Eppendorf tuubidesse (MCT) (Joonis 5). Iga kännu järel steriliseeriti puur 96%-lise etanooliga ning põletati gaasilambi leegis, vältimaks ristsaaste tekkimist. Samuti puhastati kindad etanooliga.



Joonis 5. Saepuruproovide kogumine tähistatud hariliku kuuse kännult. Foto autor: Merili Pai

Proovitükilt 4, mis on harvendamata, koguti 1,3 meetri kõrguselt juurdekasvuproovid juba varasemalt märgistatult puudelt (kokku 20 puud). Juurdekasvuproovid koguti ühes korduses steriilsetesse kilekottidesse ning desinfitseeriti juurdekasvupuur peale igalt puult proovi kogumist 96%-lise etanooliga ning põletati gaasilambi leegis.

2.3 Laboratoorsed tööd

Laboratoorseid töid teostati Eesti Maaülikooli metsandus- ja maaehitusinstituudi metsapatoloogia- ja geneetika laboris. Ühelt kännult kogutud saepuruproovid segati kokku ning kaaluti kahes korduses 0,05 grammi 2,0 ml MCT tuubidesse. Kaalumine oli vajalik, et kõik proovid oleks võrdse kogusega RT-PCR analüüsiks. Kaalumisel kasutati fooliumit, mida vahetati peale iga saepuruproovi kaalumist. Lisaks steriliseeriti töövahendid (skalpell, laud, kaal, kindad) iga kaalumise järel piirituses ja tuleleegis, et vältida ristsaastet. Kaalutud proovid asetati edasisteks analüüsides -20 °C sügavkülma.

Bakalaureusetöös kasutati reaalkaalu ehk kvantitatiivset polümeraasahelreaktsiooni (RT-PCR) hiidkooriku olemasolu ja seene DNA koguse määramiseks kõikidest kogutud saepuruproovidest (2015_1, 2015_2 ja 2017), v.a proovitükk 4 juurdekasvuproovid. Neid analüüsiti vaid juurepessu liigispetsiifiliste praimeritega. Liigispetsiifilisi juurepessu primereid kasutati patogeeni liigini määramiseks käesoleva töö autori poolt kogutud proovidest oktoober ja detsember 2017. Varasemalt kogutud proovidest (2015_1 ja 2015_2) on juurepessu liigispetsiifilised analüüsid tehtud Tannberg (2016) bakalaureusetöös. Käesoleva bakalaureusetöö labortöödeks kulus ca 250 tundi ehk poolteist kuud.

2.3.1 DNA eraldamine

Kaalutud saepuruproovidele lisati 3mm läbimõõduga viis steriilset metallkuuli, misjärel proov purustati homogenisaatoris (Retsch GmbH, Haan, Saksamaa). DNA eraldati kasutades DNA Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit-i (Leedu) vastavalt Drenkhan jt. (2014) või järgides tootjapoolset kasutusjuhendit. DNA eraldamise järel asetati proovid tagasi külma (-20 °C).

2.3.2. Reaalkaalu ehk kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon (RT-PCR)

Proovidest kontrolliti hiidkooriku (*P. gigantea*) olemasolu kahel aastal (2015_1, 2015_2, 2017) kogutud proovidest. Kokku analüüsiti hiidkooriku määramiseks RT-PCR abil N=298 saepuruproovi. Selleks kasutati RT-PCR ehk reaalkaalu PCRi. PCR seguna kasutati PCR

Master Mixi, mida kasutati ühe proovi kohta 4 µl ning millele lisati 0,4 µl Phegi-F ja Phegi-R praimerit, 0,2 µl Phegi P sondi (Riit, avaldamata andmed), 13 µl destilleeritud vett ning 2 µl DNA-d, lõppkoguseks on 20 µl üks reaktsioonisegu. Analüüside õigsuse kontrollimiseks valmistati positiivne ja negatiivne kontroll, lisades positiivsesse kontrolli hiidkooriku DNA-d ning negatiivsesse destilleeritud vett. Korraga analüüsiti 34 proovi ning lisaks positiivne ja negatiivne kontroll. Proovid analüüsiti Rotor-Gene Q-s (QIAGEN, Saksamaa) kuumutades proove 15 minutit +95 °C-ni, millele järgnes samal temperatuuril 15-sekundiline DNA denaturatsioon ning +60 °C juures minutiline praimerite omavaheline seondumine ja nii 40 kordust.

Tulemuseks saadi Ct-väärtused (*cycle threshold*), mis näitavad tsüklite arvu kui signaal ületab etteantud lävendi piiri. Ct-väärtused on pöördvõrdelised proovis oleva DNA hulga – mida madalam Ct-väärtus, seda suurem DNA hulk proovis. Kui Ct-väärtus on väiksem kui 29, siis on DNA hulk proovis kõrge, kui väärtus on 30-37, siis on DNA hulk proovi kohta keskmine ning Ct-väärtused vahemikus 38-40 näitavad, et DNA hulk proovis on madal ja sellisel juhul võib tegemist olla saastega (Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory, 2019).

2.3.3 Liigispetsiifiline polümeraasahelreaktsioon (*species specific PCR*)

Juurepessu kindlakstegemiseks kasutati liigispetsiifilist polümeraasahelreaktsiooni (PCR). Esmalt analüüsiti proove kasutades universaalpraimereid (ITS1F ja ITS4 (Gardens, Burns 1993; White jt. 1990) ning saadud positiivsetele proovidele tehti liigispetsiifilised analüüsid männi- ja kuuse-juurepessu kindlakstegemiseks ja eristamiseks. Mõlema liigi puhul tehti ühe proovi kohta eraldi PCR analüüs. Kuuse-juurepessu tuvastamiseks kasutati liigispetsiifilisi praimereid KJ-F ja KJ-R (Hantula ja Vainio, 2003) ning männi-juurepessu tuvastamiseks HetAn-F ja HetAn-R (Riit, 2014). PCR seguks kasutati 5x HOT FIREPol Blend Master Mix'i (OÜ Solis Biodyne, Tartu) ühe proovi kohta 4 µl, millele lisati vastavalt liigile mõlemat praimerit 0,5 µl (KJ-F ja KJ-R, HetAn-F ja HetAn-R), 14 µl destilleeritud vett ning 1 µl DNA-d, segu kogumahuks 20 µl. Lisaks valmistati positiivne ja negatiivne kontroll, mille puhul mainitust esimesele lisati juurepessu DNA-d ning teisele destilleeritud vett.

Kuuse-juurepessu liigispetsiifiliste praimerite puhul toimus DNA lõigu kordistamine termotsükleriga Tprofessional Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Saksamaa), mis

toimus järgnevalt: eelkuumutamine +95 °C juures 10 minutit, seejärel samal temperatuuril 40 tsüklit 30-sekundilist DNA denaturatsiooni, praimerite seondumine 35 sekundit +66 °C juures, DNA ahelsüntees 60 sekundit +72 °C juures, lõppekstensioon samal temperatuuril 10 minutit, millele järgnes masina seiskumine ning jahtumine +16 °C peale.

Männi-juurepessu liigispetsiifilise praimerite puhul toimus aga kordistamine järgnevalt: eelkuumutamine +95 °C juures 15 minutit, DNA denaturatsioon samal temperatuuril 30 sekundit, seejärel praimerite seondumine 30 sekundit +64 °C juures, DNA ahelsüntees +72 °C juures 60 sekundi vältel, lõppekstensioon jällegi +72 °C juures, misjärel masin seiskus ning jahtus 16 °C peale.

2.3.4 Geelelektrofees

Geelelektroforeesi kasutati liigispetsiifiliste kuuse- ja männi-juurepessu analüüside järgselt PCR produkti visualiseerimiseks, kontrollitakse PCR produkti olemasolu proovides. Selleks valmistati vastavalt protokollile 1%-line agarosgeel, millele lisati DNA Ladder (Naxo OÜ, Eesti) ning PCR produktid. DNA lõigu olemasolu ja vastava lõigu pikkus geelil tehti kindlaks UV kiirte all transilluminaatoriga Quantum ST4-3026/WL/25M (Vilber Lourmat SAS, Marne-la-Valée, Prantsusmaa). Pilt töödeldi Quantum ST4 Express v16.04 programmiga (Viber Lourmat SAS, Prantsusmaa), mis näitas proovides juurepessu olemasolu või puudumist.

2.3.5. Andmetöötlus

Bakalaureusetöös vajalikud andmed töödeldi programmiga Microsoft Excel. Koondati kogu katseala kohta andmestik kändude visuaalse mädaniku hinnangutega ning kännu diameetrid. Tabelisse lisati labortööde tulemused: hiidkooriku ja juurepessu esinemine kolmel erineval perioodil kogutud proovidest (2015_1, 2015_2 ja 2017). Alade kaupa arvutati juurepessu ja hiidkooriku esinemine (%) ning hiidkooriku esinemise muutus kändudes 2 aasta jooksul. ANOVA (*The one-way analysis of variance*) analüüsi kasutati töötluste ja kontrollala võrdlemiseks olulisuse nivoo $p=0,05$ korral.

3. TULEMUSED

Käesoleva bakalaureusetöö käigus koguti Järvelja Õppe- ja Katsemetskonna katsealalt (kvartalilt JS299, eraldis 18) 2017. aasta sügisel 100 kännult saepuruproovid ja 20 juurdekasvuproovi (kontrollalalt nr 4). Kogutud proovidest analüüsiti hiidkooriku (*P. gigantea*) olemasolu ja juurepessu (*Heterobasidion* spp.) esinemist. Lisaks analüüsiti ka 2015. aastal (2015_1; 2015_2) katsealalt kogutud proovidest (N=198) hiidkooriku olemasolu.

Hiidkooriku määramiseks kasutatud reaallaja ehk kvantitatiivne RT-PCR meetodika ja praimerid Phegi-F ja Phegi-R (Riit jt., avaldamata andmed) võimaldavad puiduproovidest määrata hiidkooriku esinemist ning DNA kogust proovis ehk mida suurem DNA kogus seda enam on hiidkoorikut proovis. Juurepessu esinemist kogutud proovidest tuvastati liigispetsiifiliste praimerite abil.

3.1. Visuaalne kändude mädaniku hinnang

Enne töötlemist (2015_1) läbi viidud kändude visuaalsest hinnangust (Tabel 2) selgub, et mädanikuga kände on 43 tk (N=100). Tumenenud kände on 13 tk ehk algstaadiumis mädaniku nakkusega kännud. Terveid kände (mädaniku tunnusteta) on katsealal 44 tk.

Tabel 2. Kändude visuaalne mädaniku hindamine enne töötlemist proovitükkidel, Järvelja kvartal JS299 ja eraldis 18.

Kändude visuaalne hinnang (tk)						
Proovitükk	Terve	Tumenemine	Perifeerne mädanik	Tsentraalne mädanik	Perif. + Tsentr. mädanik	Kokku
1 Rotstop	11	3	5	0	1	20
2 Kontroll	10	2	6	1	1	20
3 Karbamiid	16	1	3	0	0	20
5 Rotstop	2	5	5	7	1	20
6 Karbamiid	5	2	9	4	0	20
Kokku	44	13	28	12	3	100

3.2. Juurepessu liigilise koosseisu määramine ja tõrje efektiivsus

Kogutud saepuruproovidest (N=298) ning juurdekasvuproovidest (N=20) analüüsiti liigispetsiifiliste praimerite abil juurepessu esinemist (Tabel 3). 2015. aastal enne töötlemist (2015_1) kogutud saepuruproovidest (N=100) tuvastati molekulaaranalüüside järel kuuse-juurepessu (*H. parviporum*) esinemine proovitükkidel 3, 5 ja 6. Samal aastal 5 kuud pärast töötlemist (2015_2) kogutud proovidest (N=98) määrati mõlemat liiki juurepessu (kuuse-juurepess ja männi-juurepess) esinemine kõikidel aladelt. Suurima nakkuse osakaaluga oli ala 5 ja 6 (vastavalt Rotstopi ja karbamiidi katsealad), kus oli mõlemas nakatunud 50% kändudest, kuid proovialal 2 oli nakatunud 15% kändudest, teistel proovitükkidel (1 ja 3) oli nakkuse osakaal alla 10%. Huvitav on asjaolu, et 5 kuud peale töötlemist määrati proovidest männi-juurepessu (*H. annosum*) esinemine, mida enne töötlemist ja 24 kuud hiljem kogutud proovidest ei tuvastatud (Tabel 3). 24 kuud hiljem (2017) kogutud proovide (N=120) analüüsid näitasid, et juurepessu nakkuse hulk kõikidel aladel on vähenenud, kuid kuuse-juurepessu osakaaluks määrati 0% Rotstopiga töödeldud proovitükil nr 1 ning 25% proovitükil nr 5. Mõlemal karbamiidiga töödeldud proovitükil (3 ja 6) oli juurepessu nakatunud vastavalt 5 ja 20% kändudest (Tabel 3). Kontrollalal oli juurepessu nakkuse osakaal 10% ning raiumata alal 5%. Kaks aastat peale tõrjet juurepessu esinemine tuvastati kõikidel proovitükkidel (nakatunud 5-25% kändudest), välja arvatud Rotstopiga pritsitud proovitükil nr 1, kus juurepessu nakkust ei tuvastatud.

Tabel 3. Juurepessu kahjustuse osakaal ja tekitaja liigiline esinemine (%) analüüsitud kännu puiduproovides.

JUUREPESSU ESINEMINE (%)							
Proovitükk		Enne töötlemist (2015_1)		Viis kuud peale töötlemist (2015_2)		24 kuud peale töötlemist (2017)	
		<i>H. parviporum</i>	<i>H. annosum</i>	<i>H. parviporum</i>	<i>H. annosum</i>	<i>H. parviporum</i>	<i>H. annosum</i>
1	Rotstop	0	0	5	0	0	0
2	Kontroll	0	0	5	10	10	0
3	Karbamiid	10	0	0	5	5	0
4	Raiumata	-	-	-	-	5	0
5	Rotstop	40	0	35	15	25	0
6	Karbamiid	45	0	50	0	20	0
Kokku		19%		25,5%		10,8%	

Mõlema testitud tõrjevahendi (Rotstop ja karbamiid) mõju näitab juurepessu osakaalu vähenemist katsekäändudel kahe aasta jooksul 30%, s.o juurepessu nakkus 2015_2 (55%) ja 2017 (25%). Samas oli ka kontrollalal juurepessu nakkuse vähenemine kahe aasta jooksul 5% (Tabel 3), mis on märkimisväärselt väiksem kahanemine võrrelduna proovitükkidega kus kasutati kas Rotstopi või karbamiidi. See näitab tõrjevahendite mõju. Kuid siiski, töödeldud proovitükkidel (1 ja 5 ning 3 ja 6) võrreldes kontrollalaga (proovitükk 2) ei erine statistiliselt oluliselt erinevust ($p>0,05$) juurepessu osakaalus, seega tõrjega pole soovitud tulemust ehk olulist juurepessu pärssivat mõju kahe aasta möödudes saavutatud ($p\geq 0,05$). Mõlema tõrjevahendi vahel puudub oluline erinevus, kuna juurepessu nakkusega käändude osakaal mõlemal juhul on ühesugune 25%. Samas oluline erinevus ($p<0,05$) on juurepessu esinemisel enne töötlemist (2015_1) kontrollalal (2) võrreldes tõrje proovitükkidega 1, 3, 5, 6, kui kontrollalalt ei tuvastatud juurepessu nakkust.

3.3. Mädaniku hinnang juurepessust nakatunud käändudes

Enne töötlemist (2015_1) läbi viidud käändude visuaalse hindamise põhjal (terve, tumenemine, perifeerne mädanik, tsentraalne mädanik perifeerne + tsentraalne mädanik) ning hilisem juurepessu määramine näitasid (Tabel 4), et juurepessu leiti valdavalt tsentraalse mädanikuga käändudest (kokku 10 käнду), millele järgnevad perifeerse mädanikuga käännud (kokku 7 käнду).

Tabel 4. Molekulaaranalüüsi põhjal juurepessu nakatunud käändude mädaniku esinemine (2015_1,2015_2,2017).

Juurepessu esinemine käändudel (tk)									
Käändude visuaalne hinnang	2015_1			2015_2			2017		
	Rotstop	Karbamiid	Kontroll	Rotstop	Karbamiid	Kontroll	Rotstop	Karbamiid	Kontroll
Terve	0	0	0	2	5	1	0	2	1
Tumenemine	0	1	0	2	0	0	0	0	0
Perifeerne	1	6	0	2	5	0	1	2	0
Tsentraalne	6	4	0	4	3	0	2	2	0
Perif. + Tsentr.	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Kokku juurepessust nakatunud käändude arv	8	11	0	11	13	1	3	6	1
	19			25			10		

2015_2 proovidest selgub, et juurepessu määrati enim algselt, s.o enne töötlemist, visuaalselt terveks hinnatud kändudest (kokku 8 tk). Seitsmelt kännult määrati juurepessu esinemine võrdselt nii tsentraalse, kui ka perifeerse mädanikuga kändudelt. 2017. aasta proovides on juurepessu hulk märgatavalt vähenenud ja kokku oli nakatunud vaid 10 kändu, enim esineb juurepessu endiselt tsentraalse mädanikuga kändudel (4 kändu).

3.4. Hiidkooriku esinemine

Hiidkooriku esinemist kändudes hinnati RT-PCR metoodikat ning praimereid (Phegi-F ja Phegi-R) kasutades. Analüüsi tulemusel saadi proovi kohta numbriline väärtus (*Ct-value*), mis näitab tsüklite arvu kui signaal ületab etteantud lävendi piiri ja mida madalam *Ct*-väärtus, seda suurem on DNA sisaldus proovis (lisa 1). Käesoleva töö jaoks disainitud praimeri test õnnestus, sest kõikides proovides olnud positiivsed kontrollid tuvastati õigesti.

Tabelis 4 on välja toodud hiidkooriku esinemine 2015. aastal enne (2015_1) ja viis kuud pärast töötlemist (2015_2) ning 24 kuud töötlemise järel (2017). Analüüsitud proovidest tuvastati looduslik hiidkooriku olemasolu ehk enne töötlemist määrati hiidkooriku esinemist 7% kändudest. 5 kuud peale töötlemist on hiidkooriku esinemise osakaal kasvanud kõikidel proovialadel (Rotstop, karbamiid, kontrollalal). Hiidkooriku esinemine kõikide alade kändudel võib tuleneda sellest, et töötlemise ajal levis preparaat tuulega või putukate abil kõrval asuvatele kändudele, kuna katsealad asetsesid kõrvuti (Joonis 4). Kokku määrati 5 kuud peale töötlemist (2015_2) hiidkoorikut kogu katseala kohta 46% kändudest. Suurima hiidkooriku osakaaluga kände on proovitükil 1 (60%), seejärel proovitükkidel 3 ja 5 (Tabel 5). 24 kuud peale töötlemist (2017) analüüsitud proovidest on näha, et hiidkooriku osakaal kändudes on vähenenud, kogu katseala kohta on vaid 20% kändudest hiidkoorikuga nakatunud. Siiski, hiidkooriku esinemine on suurim just Rotstop preparaadiga töödeldud kändudes (proovitükid 1 ja 5), vastavalt 30% ja 35%, mis viitab siiski preparaadi mõjule. Karbamiidiga töödeldud proovitükkidel (3 ja 6) on hiidkooriku osakaal oluliselt vähenenud ehk see näitab, et hiidkooriku esinemine kändudes oli pigem juhuslik ning karbamiid surub maha erinevate seeneliikide arengu ja kasvu. Karbamiidiga pritsitud proovitükkidel (3 ja 6) on oluline ka asjaolu, et hiidkooriku looduslik esinemise foon enne töötlemist oli vastavalt 20% ja 5% (Tabel 5).

Tabel 5. Hiidkooriku esinemine 2015_1, 2015_2 ja 2017 kogutud kannuproovidel.

HIIDKOORIKU ESINEMISE %				
Proovitükk		Enne kändude töötlemist (2015_1)	5 kuud peale kändude töötlemist (2015_2)	24 kuud peale kändude töötlemist (2017)
1	Rotstop	5	60	30
2	Kontroll	0	40	20
3	Karbamiid	20	45	0
5	Rotstop	5	45	35
6	Karbamiid	5	40	15
Keskmine		7%	46%	20%

Kolmel aastal kogutud proovide kohta kokku tuvastati hiidkooriku esinemine 59 kannust kogu katseala kohta (lisa 1). Lisas 1 on info kändude kohta, milles hiidkoorik esines ning lisatud on vastavad Ct-väärtused. Ühe kannu (nr 8574) puhul määrati kõigis kolmes proovis hiidkooriku esinemine. Enim esineb seent 2015_2 proovides (46 kändu) ehk 5 kuud peale preparaat Rotstop kändude töötlemist. Hiidkooriku esinemine Rotstop proovitükkidel (1 ja 5) ning karbamiidi proovitükkidel (3 ja 6) võrreldes kontrollalaga ei oma statistiliselt olulist erinevust ($p > 0,05$) kõikidel proovi kogumise perioodidel (2015_1, 2015_2, 2017).

4. ARUTELU

Käesolevas bakalaureusetöös analüüsiti Järvelja Öppe- ja Katsemetskonna hariliku kuuse puistust (kv JS299, er 18) kahel aastal ja kolmel korral (2015_1, 2015_2, 2017) kogutud saepuru- ja juurdekasvuproove ning määrati juurepessu ja hiidkooriku esinemine. Kännud ja puud (kontrollalal 4) on proovitükkidel nummerdatud ning proovid koguti igal korral võrdluseks samadest kändudest ja puudest.

Juurepessu nakkuse osakaal oli proovitükkide kaupa ja kogutud proovidest järgnev: 19% (2015_1), 25,5% (2015_2), ja 10,8% (2017) (vt. Tabel 3). Valdavalt määrati proovidest kuuse-juurepessu (19%) esinemine, vähem männi-juurepessu (6%) mida tuvastati vaid viie kuu järel peale pritsimist (2015_2).

Hiidkooriku olemasolu (s.o seene DNA kogust) hinnati RT-PCR metoodika abil ning selgus, et enne kändude töötlemist (2015_1) oli hiidkooriku looduslik esinemine kändudes keskmiselt 7%, 5 kuud peale töötlemist 46% ning 24 kuud hiljem 20%. Hiidkooriku looduslik foon enne töötlemist (2015_1) oli suurim karbamiidi proovitükil (3) 20%, kuid 5 kuud peale kändude töötlemist Rotstopi proovitükil 1 (60%). Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida hiidkooriku püsivust kändudes ning 24 kuud peale töötlemist olid suurima hiidkooriku osakaaluga Rotstop proovitükid 1 ja 5 (Tabel 5). Kändude töötlemise kulu ja sellest tulenevat majanduslikku efektiivsust arvestades on oluline teada kui pika aja jooksul hiidkoorik kändudes püsib. Käesolevas töös on analüüsitud 24 kuud peale töötlemist kogutud proove ja saadi teada, et hiidkooriku esinemine kändudes on maksimaalselt 35% (keskmine 20%) proovitüki kohta (Tabel 5). Rootsisis läbiviidud katses selgus, et 4 aastat peale kändude töötlemist oli hiidkoorik endiselt töödeldud kändudes enamesinev liik (Vasiliauskas jt., 2005). Soomes läbi viidud uurimuses kontrolliti hiidkooriku pikaajalisemat esinemist (13 aastat) ning selgus, et hiidkooriku osakaal kändudes oli nii pika perioodi järel oluliselt vähenenud (Terhonen jt., 2013). Järvelja katsealal (kvartal JS299, eraldis 18) on vajalik sama tööd jätkata ning kontrollida kui kaua hiidkoorik püsib kändudes elujõulisena, mis võimaldab analüüsida preparaadi Rotstop juurepessu pärssivat pikaajalist toimet. Järvelja katse tulemused näitavad, et kui 5 kuud peale kändude töötlemist määrati hiidkooriku esinemine 46 kännus, siis 24 kuud hiljem 17 kännust (lisa 1). Põhjuseks võib

olla asjaolu, et Eestis kasutatakse Soome päritolu Rotstop prepraati ning see ei ole meie kuusikutes juurepessu tõrjeks parim valik. Seda näitas ka varasem uuring, kus tõrje efektiivsus kuusel oli madalam kui männil (Drenkhan jt., 2008). Käesoleva töö tulemusi mõjutab ka asjaolu, et preparaadiga Rotstop kändude pritsimine teostati enam kui 3 kuud peale raiet.

Kändude töötlemise efektiivsust karbamiidiga saab hinnata juurepessu osakaalu suurenemisel/vähenedes kändudes. Juurepessu osakaal kändudes oli 24 kuud hiljem vähenenud *ca* 10%-ni (Tabel 3). Karbamiidi toime suureneb kändudes teiste seente osakaal, mis surub maha eelkõige kandseente arengut ja levikut (Lipponen, 1991). Rootsis läbi viidud uuringus (Vasiliauskas jt., 2004) analüüsiti Rotstop ja karbamiidi mõju seentele üldiselt, millest selgus, et karbamiid takistas juurepessul kännu koloniseerimast. Katsest selgus, et karbamiidiga töödeldud kändudes suurenes kottseente ning teisseente hulk ja vähenes kandseente osakaal. Rotstopi puhul aga jäid püsima samad seente hõimkonnad, mis esinesid ka enne töötlemist (Vasiliauskas jt., 2004).

Käesolevas töös analüüsitud andmed koguti esmalt 5 kuud pärast kändude töötlemist, selle perioodi jooksul on Rotstop ja/või karbamiid mõju kändudes pärssinud juurepessu levikut (Tabel 5). Rotstopi efektiivsust hindavas varasemas töös (Drenkhan, 2006; Drenkhan jt., 2008) kontrolliti juurepessu olemasolu hariliku kuuse puistutes 5, 18 ja 30 kuud pärast Rotstop preparaadiga töötlemist ning selgus, et preparaadil oli töötlemise järel positiivne mõju juurepessu tõrjele. Viis kuud peale kändude pritsimist oli hiidkooriku poolt hõivatud ala kännupuidus 7 cm sügavusel vahemikus 11-24% (Drenkhan, 2006).

Töö üks eesmärk oli hinnata kändude pritsimise efektiivsust enam kui 3 kuud peale harvendusraiet, kuna selle järele oli selge praktiline huvi teostada tõrjet talviste (või ka soojade talviste) raiete järel. Tulemused viitavad sellele, et hariliku kuuse puistus on juurepessu vastase tõrje rakendamisel tarvis kände pritsida vahetult raie käigus või võimalikult kiiresti peale raiet. Enam kui 3 kuud peale raiet teostatud kändude töötlemine pole efektiivne ja tulemus on statistiliselt mitteoluline ($p > 0,05$) võrreldes kontrollalaga. Tõrjevahendite mõju pärsib ka see, et proovitükkidel 5 ja 6 on teostatud varasemad hooldusraied (2005. aastal), mistõttu oli mõlemal alal enne kändude töötlemist juurepessu osakaal kõrge (vastavalt 40% ja 45%). Rotstop preparaadi toime väheneb kui kändudes on varasem tugev juurepessu nakkus (Redfern ja Stenlid, 1998). Rotstop toimib efektiivsemalt

kännu pinnal areneva juurepessu tõrjel. Seega, Järvelja Rõka katseala oma olemuselt ei olnud antud tööks parim valik.

Tõrje tulemust mõjutab ka kändude töötlemise efektiivsus, väga oluline on jälgida, et känd oleks preparaadi lahusega täielikult kaetud. Rootsis on läbiviidud katse (Berglund ja Rönnberg, 2004), kus kändude töötlemise osakaal hiidkoorikuga oli erinev (känd töödeldi 100%, kännust töödeldi 75%, känd töödeldi vaid 50% ulatuses ja ribadena ning kändu ei töödeldud üldse). Proovid koguti 3 ja 12 kuud pärast kändude töötlust ning tulemustest selgus, et 12 kuud peale töötlemist tuvastati kõige enam juurepessu töötlemata kändudest (69%), kõige vähem juurepessust nakkust oli 100% töödeldud kändudes (26%). Rootsis teostatud uuringus suurenes aja möödudes hiidkooriku esinemine kändudes: kolme kuu möödudes esines seent 19% kändudest; 12 kuu järel aga 74% kändudest. Käesolevas bakalaureusetöös määrati hiidkooriku osakaaluks 5 kuud peale Rotstop preparaadiga töötlemist proovitükkidelt 1 ja 5, vastavalt 60% ja 45% (Tabel 5). See viitab sellele, et pritsimise efektiivsus on olnud hea.

Rotstop preparaadi puhul on tegemist loodusliku biotõrjevahendiga ning selle olemasolu (DNA hulka) puiduproovidest on RT-PCR meetodika abil võimalik määrata ka aastate möödudes. Töö tulemustest järeldati, et käesoleva töö jaoks disainitud RT-PCR praimerid võimaldavad tuvastada hiidkooriku esinemist ja rohkest töödeldud ja töötlemata kändudes. Hiidkooriku uue praimerit testimine oli vajalik, sest see võimaldab tuvastada, kas kändu on pritsitud biopreparaadiga Rotstop. Lisaks vähendab praimer laboratoorset töömahtu, kuna varasemalt koguti hiidkooriku määramiseks puidukettad, misjärel puhastati need harja ja veega ning jäeti mitmeks päevaks inkubeerima ning seejärel isoleeriti seened puhaskultuuri ja määrati nende liik ja hinnati tõrje efektiivsus (Drenkhan, 2006).

Töö tulemustest selgus, et Rotstopiga töödeldud proovitükkidel oli 24 kuud peale kändude töötlemist juurepessu osakaal vahemikus 0-25% ja karbamiidiga aladel 5-20%. Kahe aasta järel on mõlema preparaadi tõrje efektiivsus kändudes ligikaudselt võrdne. Juurepessu tõrje efektiivsuse hindamiseks tuleks proove koguda ka kännu juurtest. Sel viisil on võimalik hinnata kas Rotstop preparaadi toime on jõudnud ka juurtesse ning seejärel analüüsida tõrje efektiivsust. Hariliku kuuse kändude töötlemine raie järgselt on kahtlemata vajalik, et pärssida juurepessu levikut, sest kuusk on Eestis majanduslikult ja ökoloogiliselt väga oluline puuliik. Kuusikute tervisliku seisundi parandamiseks tuleb arvestada mitmete aspektidega: selleks, et vältida juurpessu levikut puistus tuleks hooldusraieid teostada vaid

talvel ning sealjuures jälgida keskmist õhutemperatuuri (kindlasti on vaja preparaat Rotstopi kasutada kui ööpäevane õhutemperatuur on $+5^{\circ}\text{C}$ ja enam); uue metsakultuuri rajamisel ning juurepessu leviku pärssimiseks hariliku kuuse puhtpuistu asemel eelistada lehtpuid või kuuse ja lehtpuu segametsa.

KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöös uuriti juurepessu tõrjeks kasutatavate biopreparaat Rotstopi ja karbamiidi efektiivsust 5 kuud ja 24 kuud pärast kändude töötlemist kui kändude töötlemine tehti enam kui 3 kuulise ajalise nihkega. Lisaks analüüsiti kogutud proovidest hiidkooriku ehk Rotstopi alusorganismi esinemist kändudes enne töötlemist. Üheks töö eesmärgiks oli ka testida uut hiidkooriku liigispetsiifilist reaalaja ehk kvantitatiivset RT-PCR praimerit.

Proovid koguti kolmel korral Järvelja Öppe- ja Katsemetskonna kvartalilt JS299, eraldiselt 18, mis oli jagatud kuueks võrdseks proovitükiks, kus 1 ja 5 töödeldi Rotstopiga, 3 ja 6 karbamiidiga ning proovitükk 2 jäeti kontrollalaks ning alal 4 raiet ei teostatud.

Enne kändude (N=100, katsealalt 4 proove ei kogutud) töötlemist kogutud proovidest selgus, et juurepessu esines 19% kogu katseala kändudes, kus kahel proovitükil puudus nakkus täielikult ning teistel proovitükkidel jäi see vahemikku 10-45%. 5 kuud peale töötlemist oli juurepessu nakatunud kändude osakaal kogu katsealal 25,5%, kus nakatunud olid kõik alad ning esines ka männi-juurepessu nakkust. Enim esines juurepessu karbamiidiga (6) ja Rotstopiga töödeldud proovitükil (5), kus katsealast olid nakatunud pooled kändud. 2017. aasta proovidest selgus, et juurepessu osakaal on vähenenud ning kogu katsealast on nakatunud 10,8% kändudest. Kahe aasta järel peale pritsimist männi-juurepessu proovidest ei tuvastatud ning enim esines kuuse-juurepessu Rotstop alal (5), kus nakatunud oli 25% kändudest. Raiumata alal (4), s.t ka töötlemata, esines juurepessu 5%.

Kogutud proovidest hiidkooriku esinemist analüüsides selgus, et enne töötlemist esines looduslikult hiidkoorikut 7% kändudest. Viis kuud pärast kändude töötlemist tuvastati hiidkoorikut keskmiselt 46% kändudest. 24 kuud hiljem kogutud proovid näitasid aga hiidkooriku osakaaluks 20%, kuid seent leiti ka kändudelt, kus varasemalt seda ei tuvastatud. Seega kahe aastase hinnangu järel, Rotstopi ja karbamiidi pritsimine kuuse kändudele enam kui kolme kuulise viitega peale raiet ei andnud juurepessu tõrjeks rahuldavaid tulemusi võrreldes kontrollalaga. Kahe tõrjeviisi vahel ei olnud olulist statistilist erinevust. Rotstop ja karbamiidi efektiivsuse võrdlemiseks on vaja pikemajalisi analüüse.

Saadud tulemuste põhjal võib tõdeda, et okaspuupuistutes on kändude töötlemine pärast harvendus- ja lageraiet ning töötlemine on efektiivsem kui see teostada vahetult raie käigus või kohe peale raie teostamist. Kändude töötlemine aitab kaasa juurepessu kasvu pärssimisele või takistab selle levikut. Juurepess levib ka juurte kaudu puult-puule, siis karbamiidi puhul on kaitse vaid kännu pinnal ning puudub mõju kännu sees või juurtes. Rotstop preparaat põhineb teisel meie looduses esineval seenel (hiidkoorik), mis on võimeline kännus edasi kasvama ning avaldab pikemaajalist mõju juurepessu osakaalu vähenemisele ka puujuurtes.

KASUTATUD KIRJANDUS

Aastaraamat Mets 2016. 2017. Tallinn. Keskkonnaagentuur. 293 lk.

Baltic Agro. (<https://koduaid.balticagro.ee/et/aiavaetised/105-karbamiid-4742604001927.html>) (16.05.2019)

Berglund, M., Rönnerberg, J., 2004. Effectiveness of treatment of Norway spruce stumps with *Phlebiopsis gigantea* at different rates of coverage for the control of *Heterobasidion*. – Forest pathology, 34, p 233-243.

Drenkhan, R., Adamson, K., Jürimaa, K., Hanso, M. 2014. *Dothistroma septosporum* on firs (*Abies* spp.) in the northern Baltics. – Forest Pathology, 44 (3), p 250–254.

Drenkhan, T. 2006. Bioregulaator Rotstop®'i kasutamine juurepessu profülaktikas. Magistritöö. Tartu. 80 lk + lisad.

Drenkhan, T. 2011. Bioregulaator Rotstop juurepessu vastu. Eesti Mets, 2, lk 32-34.

Drenkhan, T., Hanso, S., Hanso, M. 2008. Effect of the Stump Treatment with *Phlebiopsis gigantea* against *Heterobasidion* Root Rot in Estonia. – Baltic Forestry, 14 (1), p 16-25.

Gardens, M., Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. – Molecular Ecology, 2, p 113-118.

Hanso, M., Drenkhan, T. 2005. Seenega seene vastu. Eesti Loodus, 1, lk 16-19.

Hanso, M., Õunap, H. 2016. Olulisemad metsakahjustused ja nende vältimine. SA Erametsakeskus. Tartu. 44 lk.

Hanso, S., Hanso, M. 1999a. Juurepessu levimisest Eesti metsades. Metsanduslikud uurimused XXXI, lk 162–172.

Hanso, S., Hanso, M. 1999b. Andmeid juuremädanike tekitajate kohta Eesti metsadest. Metsanduslikud uurimused XXXI, lk 141-161

Hantula, J., Vainio, E. 2003. Specific primers for the differentiation of *Heterobasidion annosum* (s.str.) and *H. parviporum* infected stumps in Northern Europe. – *Silva Fennica*, 37, p 181-187.

Holdenrieder, O., & Greig, B.J.W. 1998. Biological methods of control. In: S. Woodward, J. Stenlid, R. Karjalainen, & A. Hüttermann (Eds.), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. CAB International. Wallingford. p 235 – 258.

Johansson, S.M., Pratt, J.E., Asiegbu, F.O., 2002. Treatment of Norway spruce and Scots pine stumps with urea against the root and butt rot fungus *Heterobasidion annosum* -possible modes of action. – *Forest Ecology and Management*, 15, p 87-100.

Järvselja Metsamajandamise Infosüsteem (www.jarvselja.emu.ee) (14.02.2019)

Korhonen, K., Lipponen, K., Bendz, M., Johansson, M., Ryen, I., Venn, K., Seiskari, P., Niemi, M. 1994. Control of *Heterobasidion annosum* by stump treatment with “Rotstop,” a new commercial formulation of *Phlebiopsis gigantea*. – In: M. Johansson, J. Stenlid (Eds.), *Proceedings of the Eight International Conference on Root and Butt rots, Sweden and Finland, August 9–16, 1993*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, p 675–685.

Lipponen, K. 1991. Stump infection by *Heterobasidion annosum* and its control in stands at the first thinning stage. – *Folia Forestalia*, 770, p 1-12.

Metsaregister. (<https://register.metsad.ee/#/>) (02.05.2019)

Niemelä, T. 2008. Kuuse-juurepess. Torikseened Soomes ja Eestis. Eesti Loodusfoto. Tartu, lk 13, 128-130.

Pettersson, M., Rönnerberg, J., Vollbrecht, G., Gemmel, P. 2003. Effect of Thinning and *Phlebiopsis gigantea* Stump Treatment on the Growth of *Heterobasidion parviporum* Inoculated in *Picea abies*. – *Scandinavian Journal of Forest Research*, 18, p 362-367.

Piri, T., 1996. The spreading of S-type *Heterobasidion annosum* from Norway spruce stumps to the subsequent tree stand. – *Forest Pathology*, 26, p 193-204.

Piri, T., Korhonen, K. 2008. The effect of winter thinning on the spread of *Heterobasidion parviporum* in Norway spruce stands. – Canadian Journal of Forest Research, 38, p 2589-2595.

Redfern, D.B., Stenlid, J. 1998. Spore dispersal and infection. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (Eds.), *Heterobasidion annosum: biology, ecology, impact and control*. Wallingford, UK: CAB International, p. 105–141.

Riit, T. 2014. PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks. Magistritöö. Tartu. 58 lk.

Rishbeth, J. 1951a. Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East Anglian pine plantations. II. Spore production, stump infection, and saprophytic activity in stumps. – Annals of Botany, 15, p 1-21.

Rishbeth, J. 1951b. Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East Anglian pine plantations. III. Natural and experimental infection of pines, and some factors affecting severity of the disease. – Annals of Botany, 15, p 221-246.

SA Järvselja Õppe- ja Katsemetskond. (www.jarvselja.ee) (14.02.2019)

Swedjemark, G., Stenlid, J. 1993. Population dynamics of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies*. – Oikos, 66, p 247-254.

Tannberg, R. 2016. Juurepessu tõrjemeetodid hariliku kuuse puistus. Bakalaureusetöö. Tartu. 33 lk.

Terhonen, E., Sun, H., Buée, M., Kasanen, R., Paulin, L., Asiegbu, F.O. 2013. Effects of the use of biocontrol agent (*Phlebiopsis gigantea*) on fungal communities on the surface of *Picea abies* stumps. – Forest Ecology and Management, 310, p 428-433.

Thor, M., Stenlid, J. 2005. *Heterobasidion annosum* infection of *Picea abies* following manual or mechanized stump treatment. – Scandinavian Journal of Forest Research, 20, p 154-164.

Vasiliauskas, R., Larsson, E., Larsson, K.-H., Stenlid, J. 2005. Persistence and long-term impact of Rotstop biological control agent on mycodiversity in *Picea abies* stumps. Swedish University of Agricultural Sciences. – Biological Control, 32; 2, p 295-304.

Vasiliauskas, R., Lygis, V., Thor, M., Stenlid, J. 2004. Impact of biological (Rotstop) and chemical (urea) treatments on fungal community structure in freshly cut *Picea abies* stumps. – Biological Control, 31, p 405-413.

Westlund, A., Nohrstedt, H.-Ö. 2000. Effects of Stump-treatment Substances for Root-rot Control on Ground Vegetation and Soil Properties in a *Picea abies* forest in Sweden. – Scandinavian Journal of Forest Research, 15, p 550-560.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Eds). M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsk, T. J. White. Academic PressInc. New York. p 315-322.

Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory (<https://www.wvdl.wisc.edu/>) (23.05.2019)

Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. 1998. *Heterobasidion annosum*: Biology, Ecology, Impact and Control. CAB International, Wallingford.

LISAD

Lisa 1. Hiidkooriku esinemisega proovid ning nende real-time PCR analüüsi näidud (Ct-value).

Ala	Jrk nr	KÄND	Enne töötlemist		Pärast töötlemist		2 aastat hiljem	
1	1	9760	-		+	36,21	+	36,25
	2	8882	-		+	38,62	-	
	3	9802	-		+	32,93	+	35,24
	4	8900	-		+	32,86		
	5	9150	-		+	17,04	-	
	6	9067	-		+	21,04	+	20,72
	7	9071	-		+	21,21	-	
	8	8933	-		-		+	38,78
	9	8400	-		+	27,13	-	
	10	8574	+	39,39	+	35,48	+	34,44
	11	8352	-		+	15,33		
	12	8332	-		+	24,55	-	
	13	8935	-		-		+	31,82
	14	8331	-		+	21,74	-	
2	15	8744	-		+	39,66	-	
	16	9761	-		+	39,77	-	
	17	9804	-		+	21,37	-	
	18	8758	-		-		+	36,04
	19	8736	-		+	34,91	-	
	20	9090	-		+	38,31	-	
	21	8734	-		-		+	36,93
	22	8401	-		+	28,3		
	23	8515	-		+	23,91		
	24	8398	-		-		+	24,19
	25	8393	-		+	23,24	-	
3	26	8893	+	37,37	+	32,44	-	
	27	9759	-		+	27,65	-	
	28	8890	-		+	34,83	-	
	29	8886	+	34,17	+	18,87	-	
	30	8759	+	33,23	+	38,33		
	31	8425	-		+	21,41	-	
	32	8324	-		+	24,88		
	33	8959	-		+	25,41	-	
	34	8929	-		+	29,83	-	
	35	8358	+	21,59	-		-	
5	36	9734	-		+	21,23		
	37	9126	-		+	24,18	-	
	38	9176	-		+	33,75	-	

	39	9135	-		-		+	37,67
	40	9078	-		+	36,29	-	
	41	9981	-		+	28,89	+	38,41
	42	9123	-		+	23,64	-	
	43	9100	-		+	25,55	-	
	44	9747	-		-		+	31,8
	45	9146	-		-		+	26,74
	46	9154	-		-		+	33,23
	47	9164	+	38,1	-			
	48	9109	-		+	28,37	-	
	49	9085	-		+	24,66	-	
6	50	9076	-		+	29,43	-	
	51	9973	-		-		+	38,85
	52	9731	+	26,06	+	36,06	-	
	53	9105	-		+	20,52	-	
	54	9969	-		+	19,91	-	
	55	9162	-		+	24,44	-	
	56	9174	-		-		+	38,01
	57	9120	-		+	22,49	+	26,13
	58	9727	-		+	27,71	-	
	59	9976	-		+	23,62	-	

Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Merili Pai,

(sünnipäev 01.05.1996)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö Biopreparaat ROTSTOP® ja karbamiidi efektiivsuse hinnang juurepessu tõrjel hariliku kuuse (*Picea abies* (L.) Karst.) puistus,

mille juhendaja(d) on Tiia Drenkhan ja Rein Drenkhan,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

- 2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
- 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

(allkiri)

Tartu, _____

(kuupäev)

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)